

表达 *sFat-1* 基因慢病毒载体的构建及病毒生产

朱贵明^{1,2}, 陈 宏^{1,3}, 高 强², 陈红星², 邓继先²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071;

3 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] 为了建立有效地用于转基因动物生产的慢病毒表达系统, 以线虫 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因(*sFat-1*)为目的基因构建了慢病毒表达载体, 通过与慢病毒包装载体 PL P1、PL P2 和 PL P/VSVG 一起共转染 293FT 细胞系生产了慢病毒颗粒, 并对其感染哺乳动物细胞 NIH3T3 细胞系的能力进行了检测。结果表明, 该系统所生产的病毒滴度约为 5.0×10^6 TU/mL, 这种病毒能够感染哺乳动物细胞, 说明构建的慢病毒表达系统是有效的, 应用其可以生产感染力良好的慢病毒颗粒, 并高效地进行 *sFat-1* 基因转移。

[关键词] 慢病毒载体; 转基因; 基因表达; ω -3 脂肪酸去饱和酶基因

[中图分类号] Q784; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0006-05

Construction of a lentiviral vector for *sFat-1* gene expression and production of lentivirals

ZHU Gui-ming^{1,2}, CHEN Hong^{1,3}, GAO Qiang², CHEN Hong-xing², DENG Ji-xian²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of

Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 3 Institute of Cellular and Molecular

Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: In this research, a lentiviral vector system was constructed for the expression of *sFat-1*, a gene from *C. briggsae* encoding ω -3 fatty acid desaturase. By co-transfection of plasmids PL P1, PL P2, and PL P/VSVG with this vector, lentiviral particle produced 293FT cells, and the infection capacity of the lentiviral particle was tested by NIH3T3 cell line. Results demonstrated that this lentiviral expression system was successfully established, and it could be used to produce lentiviral particle with high efficient infection capacity for *sFat-1* gene delivery.

Key words: lentiviral vectors; transgene; gene expression; ω -3 fatty acid desaturase gene

慢病毒属于逆转录病毒, 是 RNA 病毒。当病毒感染宿主细胞时, 病毒 RNA 在宿主细胞质中反转录成双链的 DNA, 转运至细胞核后直接整合到宿主 DNA 上, 然后病毒 DNA 以前病毒的形式进行表达。与普通的逆转录病毒相比, 慢病毒基因组结构更为复杂, 除 *gag*、*pol*、*env* 3 个与普通逆转录病毒相似的结构基因外, 还包括 4 个辅助基因 *vif*、*vpr*、

nef、*vpu* 和 2 个调节基因 *tat* 和 *rev*^[1-3]。由此可将慢病毒的 RNA 序列分成顺式元件和反式元件两部分。顺式元件包括病毒基因反转录、转录、整合和包装所必需的调控序列, 可被改造为转移外源基因的表达载体; 反式元件由编码病毒颗粒所需的包装蛋白的基因构成, 可被改造为包装载体。将上述表达载体和包装载体转染到合适的细胞可产生复制缺陷

† 收稿日期: 2006-04-29

[基金项目] 国家“863”计划项目(2006AA10Z197); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目

[作者简介] 朱贵明(1978-), 男, 贵州威宁人, 在读博士, 主要从事动物遗传育种与转基因研究。

[通讯作者] 陈 宏(1955-), 男, 陕西长安人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。

性的病毒,病毒感染靶细胞后将目的基因稳定地整合到宿主基因组上。因此,慢病毒经过以上改造可以作为基因转移的载体^[4-5]。慢病毒载体是一种高效的转基因载体,多年来一直被用于细胞和组织转染及基因治疗方面的研究,直到近几年才开始被用于转基因动物的研究。自2000年至今,国际上已陆续以慢病毒为载体介导生产了转基因小鼠、大鼠、鸡、猪、牛等动物^[6-9]。慢病毒载体法已逐渐被证实较其他转基因方法更高效,所以有望成为生产转基因动物的一种有力手段。然而所有这些研究都是以报告基因,即绿色荧光蛋白(GFP)基因为外源基因进行的,迄今尚未见应用该方法导入其他基因的报道。本研究以线虫 *C. briggsae* 的 ω -3脂肪酸去饱和酶基因(*sFat1*)为外源基因,构建了用于转基因动物研究的慢病毒载体,并成功生产了有感染能力的慢病毒颗粒,可用于动物胚胎的感染进而生产转基因动物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂、质粒及细胞 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶以及 RT-PCR 试剂盒,均购于大连宝生物工程有限公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒,均购于 V-gene 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品;质粒 pcDNA3.1-*sFat1*、7ZF-PLV、7ZF-PLV- β -casein、PLP1、PLP2 和 PLP/VSVG 以及细胞系 293FT 和 NIH3T3,均为军事医学科学院生物工程研究所细胞工程实验室所构建或保存;DMEM、胎牛血清等细胞培养试剂,均为 Hyclone 公司产品。

1.1.2 引物 根据质粒 pcDNA3.1-*sFat1* 的序列设计1对引物,用以扩增该质粒中 *sFat1* 基因序列。上游引物(P1F)为 5'-GTTGGGCCACCATG-GTCGCTCATTCCTC-3',下游引物(P1R)为 5'-GTTGGA TCCTTACTTGGCTTTAGCCTTCTC-3',上、下游引物分别引入酶切位点 *Sma*I 和 *Bam*HI。另外,根据质粒 7ZF-PLV- β -casein 的序列设计1对检测引物,上游引物(P2F)为 5'-GATTGA-CAAGTAATACGCTGTTTCCTC-3',下游引物(P2R)为 5'-CATCAGAAGTTAAACAGCACAGT-TAG-3'。

1.2 慢病毒表达载体的构建

1.2.1 慢病毒表达载体 7ZF-PLV- β -*sFat1* 的构建 以 *Sma*I 和 *Bam*HI 双酶切质粒 7ZF-PLV- β -

casein,用 PCR 产物纯化试剂盒回收酶切产物。以质粒 pcDNA3.1-*sFat1* 为模板,用 PCR 方法扩增 *sFat1* 基因片段。PCR 反应体系为:ddH₂O 40 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L 4 $\times$ dNTP 1 μ L, 10 μ mol/L 上游引物(P1F) 1 μ L, 10 μ mol/L 下游引物(P1R) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1 μ L, 模板 1 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 PCR 产物纯化试剂盒回收 *sFat1* 片段。*sFat1* 片段在 T4 DNA 连接酶的作用下与经过双酶切处理的质粒 7ZF-PLV- β -casein 于 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,并在氨苄青霉素抗性 LB 平板上进行筛选。阳性克隆的质粒 7ZF-PLV- β -*sFat1* 用 *Sma*I、*Bam*HI 双酶切初步鉴定,然后再进行测序,测序由军事医学科学院生物工程研究所核酸分析实验室完成。

1.2.2 慢病毒表达载体 7ZF-PLV-GFP 的构建

将质粒 7ZF-PLV 用限制性内切酶 *Sma*I 酶切,待酶切反应完毕后直接加入小牛小肠碱性磷酸酶(CIAP),于 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 进行去磷酸化反应,结束后用 PCR 产物纯化试剂盒回收产物;同时,用 *Ase*I 和 *Afl*I 双酶切质粒 pEGFP-N1,酶切反应完毕后直接加入 klenow 聚合酶,于 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 进行补平,产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,然后用胶回收试剂盒回收 1 632 bp 的片段,将此片段与上述经酶切和去磷酸化处理的质粒 7ZF-PLV 用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,并在氨苄青霉素抗性 LB 平板上进行筛选。阳性的 7ZF-PLV-GFP 质粒用 *Eco*R I 酶切初步鉴定,然后再进行测序。测序由军事医学科学院生物工程研究所核酸分析实验室完成。

1.3 动物转基因慢病毒的生产

1.3.1 表达载体为 7ZF-PLV- β -*sFat1* 的慢病毒的生产 在一 5 mL 试管中加入 1.5 mL 无血清培养基,溶解 9 μ g 慢病毒的 3 个包装质粒混合物(PLP1、PLP2 和 PLP/VSVG 各 3 μ g)以及 3 μ g 慢病毒表达质粒 7ZF-PLV- β -*sFat1*,轻混匀。在另一 5 mL 试管中将 36 μ L 脂质体 Lipofectamine 2000 溶于 1.5 mL 无血清培养基中,轻混匀,室温孵育 5 min。将上述两只试管中的溶液合并,轻混匀,室温孵育 20 min,形成脂质体-DNA 复合物。在温育期间,将培养的 293FT 细胞系消化并计数,悬浮于生长培养基(含血清但不含抗性物质)中,调整密度为

$1.2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。取一 10 cm 培养皿,先向其中加入 5 mL 生长培养基(同样含血清但不含抗性物质),再加入上述脂质体-DNA 复合物,最后加入上述处理的 293FT 细胞系悬液 5 mL,轻摇平皿混匀,置 CO_2 孵箱内培养。次日更换为完全培养基(含体积分数 10 %胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、10 mg/L 双抗以及 1 mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM)。在转染后 72 h 收集上清至 5 mL 试管中,4 3 000 r/min 离心 15 min,用 0.45 μm 滤器过滤。按 1 mL/管分装至冻存管,并于 -80 冻存备用。

1.3.2 表达载体 7ZF-PLV-GFP 慢病毒的生产 按照 1.3.1 的方法进行,仅将质粒 7ZF-PLV- β -sFat1 更换为 7ZF-PLV-GFP 即可。

1.4 慢病毒感染力的检测

将 NIH3T3 细胞系消化并计数,铺于 6 孔板培养,待细胞生长至 6 孔板底面积的 30 %~50 %即可进行转染。将上述冻存的慢病毒液解冻后,用完全培养基进行 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} 及 10^{-3} 倍稀释(终体积均为 1 mL),注意不要振动。将上述 4 份慢病毒的稀释液轻轻倒转混匀,加到弃除培养液的 6 孔板中的 4 个孔,再轻轻转动 6 孔板以混匀,37 培养过夜。次日移去培养液,重新加入 2 mL 完全培养基。对于 7ZF-PLV- β -sFat1 转染组,在转染后 72 h 收

集细胞,按 Trizol 试剂和说明书提供的方法提取细胞 RNA,用 RT-PCR 检测目的基因 *sFat-1* 的表达,以鉴定慢病毒的感染力。其中 RNA 反转录按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行。PCR 反应体系为: ddH₂O 20 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL , 10 mmol/L 4 $\times$ dNTP 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物(P2F) 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物(P2R) 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL , 模板 0.5 μL 。PCR 反应条件为:94 预变性 4 min;94 变性 30 s,58 退火 30 s,72 延伸 80 s,35 个循环;72 10 min,4 保存。

对于 7ZF-PLV-GFP 转染组,在转染后 72 h 观察 GFP 的表达情况,并计数,根据 GFP 的表达量即可判断慢病毒的感染力。

2 结果与分析

2.1 慢病毒表达载体 7ZF-PLV- β -sFat1 和 7ZF-PLV-GFP 的构建

2.1.1 慢病毒表达载体 7ZF-PLV- β -sFat1 的构建 质粒 7ZF-PLV- β -casein 经双酶切定向插入 *sFat-1* 基因序列,得到长度为 10 500 bp 的慢病毒表达载体 7ZF-PLV- β -sFat1。取阳性克隆的质粒,用 *Sma* I、*Bam* H I 双酶切,结果表明随机选取的 4 个克隆中有 3 个为所需的正确克隆(图 1)。

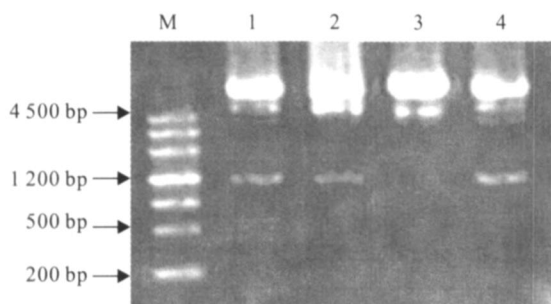


图 1 重组质粒 7ZF-PLV- β -sFat1 的 *Sma* I、*Bam* H I 双酶切鉴定结果

M. DNA Marker; 1~4. 4 株不同的克隆

Fig. 1 Confirmation of recombinant plasmid 7ZF-PLV- β -sFat1 by restriction analysis by double cut with *Sma* and *Bam* H

M. DNA Marker; 1 - 4. Recombinant colonies

2.1.2 慢病毒表达载体 7ZF-PLV-GFP 的构建 质粒 pEGFP-N1 经酶切获得 1 632 bp 的 *GFP* 基因,定向插入质粒 7ZF-PLV,获得 7 072 bp 的慢病毒表达载体 7ZF-PLV-GFP。用 *Eco* R 酶切鉴定重

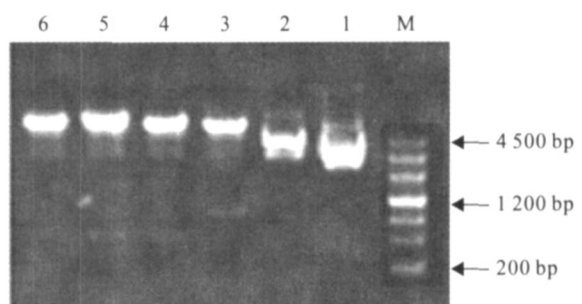


图 2 重组质粒 7ZF-PLV-GFP 的 *Eco* R I 酶切鉴定结果

M. DNA Marker; 1~6. 6 个不同的克隆

Fig. 2 Confirmation of recombinant plasmid 7ZF-PLV-GFP by restriction analysis by cut with *Eco* R I

M. DNA Marker; 1 - 6. Recombinant colonies

组克隆,若为正向连接则可以从载体上切下一个 635 bp 的片段,若为反向连接则可以切下一个 1 023 bp 的片段。由图 2 可见,3,4,5 和 6 均为插入目的基因的克隆,但 3 为反向连接,4,5 和 6 为正向连

接。

2.2 慢病毒颗粒的生产

结果显示,转染后 72 h,在转染的两组细胞中均可看到由于病毒产生后使细胞形成的合胞体这一特殊现象。对于 7ZF-PL V- GFP 转染组,由于表达载体带有 GFP 报告基因,在荧光显微镜下可以看到外源基因大量表达后所发生的绿色荧光(图 3)。两组转染细胞发生的类似变化可以说明它们已产生了病毒。

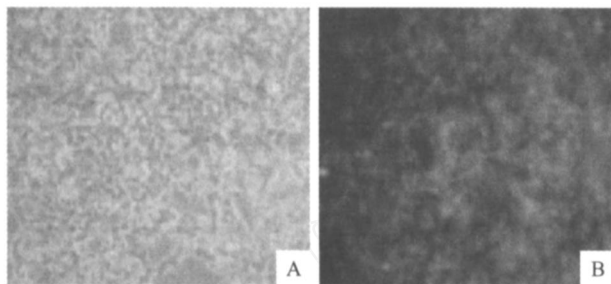


图3 慢病毒表达载体和包装质粒共转染

293FT 细胞系产生慢病毒(100 ×)

A. 7ZF-PL V- Pβ-sFat1 转染组;B. 7ZF-PL V- GFP 转染组

Fig. 3 Production lentivirus by co-transfection 293FT cells with lentiviral vectors and packaging plasmids(100 ×)

A. 7ZF-PL V- Pβ-sFat1 transfection;

B. 7ZF-PL V- GFP transfection

2.3 慢病毒感染力的鉴定结果

试验结果表明,慢病毒对 NIH3 T3 细胞系具有感染能力,并且与不同的稀释倍数相关。感染表达载体 7ZF-PL V- Pβ-sFat1 的慢病毒颗粒 RT-PCR 鉴

定结果表明,目的基因 *sFat1* 已经被有效地转移到 NIH3 T3 细胞系中(图 4);感染表达载体 7ZF-PL V- GFP 的慢病毒颗粒表达了目的基因 GFP,慢病毒对细胞的感染力直接反映在带绿色荧光的细胞数量上(图 5)。从图 5 可以很明确地看到,病毒液稀释的倍数越高,感染的细胞越少。对 GFP 计数后可知,本试验中该慢病毒的生产体系所获得的病毒滴度约为 5.0×10^6 TU/ mL。

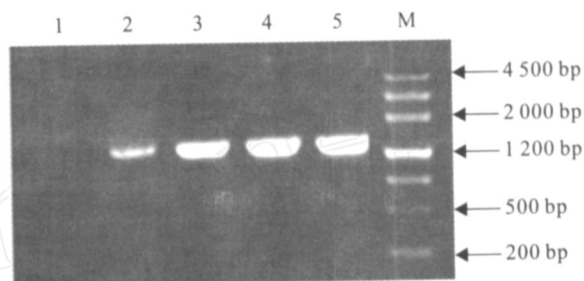


图4 包装质粒为 7ZF-PL V- Pβ-sFat1 慢病毒感染力的 RT-PCR 检测结果

1. 阴性对照(以未转染 NIH3 T3 细胞系 cDNA 为模板的 PCR 结果);2~5. 以 $10^0 \sim 10^{-3}$ 倍稀释慢病毒感染的 4 株 NIH3 T3 细胞系 cDNA 为模板的 PCR 结果;M. DNA Marker

Fig. 4 *sFat1* gene expression detected by RT-PCR after lentiviral particle(packaged with 7ZF-PL V- Pβ-sFat1)infection of NIH3 T3 cell line

1. Negative control(PCR result of cDNA extracted from non-infected NIH3 T3 cells);2-5. PCR result of cDNA extracted from NIH3 T3 cells infection with $10^0 - 10^{-3}$ serial dilutions of lentiviral particle;M. DNA Marker

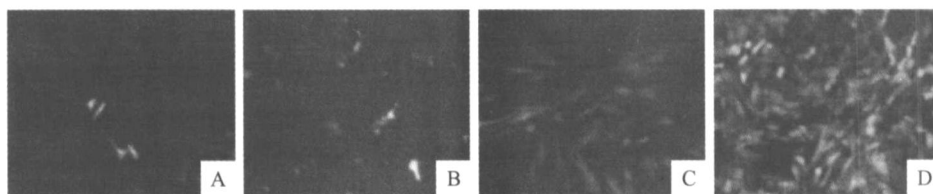


图5 包装质粒为 7ZF-PL V- GFP 慢病毒感染力的检测结果(200 ×)

A~D. 分别为 $10^0 \sim 10^{-3}$ 倍稀释慢病毒感染的 4 株 NIH3 T3 细胞系所检测到的绿色荧光

Fig. 5 GFP expression after lentiviral particle (7ZF-PL V- GFP) infection of NIH3 T3 cell line(200 ×)

A - D. Green fluorescence detected from NIH3 T3 cells infection with $10^0 - 10^{-3}$ serial dilutions of lentiviral particle

3 讨论

作为一种生产转基因动物尤其是大型转基因动物的手段,慢病毒载体方法的优势是很明显的。慢病毒载体法是一种高效的反转录转导技术,它的优越性在于:(1)能够介导外源基因在靶染色体上的稳定整合,从而使转基因可以长期表达;(2)载体可以

容纳较大片段的外源基因;(3)扩大了基因转移的宿主范围,不但能感染分裂细胞,也能够感染静止细胞^[1-2]。慢病毒载体为基因治疗和转基因动物生产提供了一个安全有效的途径。但是它也需要不断的发展和改进才能够更有效、更广泛地用于转基因动物生产的实践。慢病毒载体需要发展和改进的方面包括:提高载体系统的安全性,如尽量消除由于同源

重组产生野生型慢病毒(如 HIV-1)的可能性;最大限度地提高载体系统的有效性(尽可能高的病毒滴度是一个最重要的因素)^[4-5,10]。

近几年来,应用慢病毒载体法生产的转基因动物都是以 GFP 基因为目的基因,这使得试验操作较为容易,获得转基因动物的几率也更高。显然,利用慢病毒载体法向动物导入一些具有现实应用价值的基因还存在一定困难。本试验将线虫 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat1* (该基因已被证实具有很大的开发应用价值)作为目的基因,进行慢病毒生产和感染的研究,同时使用另一表达 GFP 的慢病毒载体来估测 *sFat1* 的表达情况。也就是说,包装了表达载体 7ZF-PLV-P β -sFat1 的慢病毒滴度,应该与包装了表达载体 7ZF-PLV-GFP 的慢病毒滴度相近。本研究结果表明该方法是可行的,这对今后类似的研究有一定的借鉴意义。本研究所获得的病毒滴度与文献[5,10]相比并不算高。这是由不同的研究中慢病毒生产和病毒滴度估测的方法不同造成的。所以,比较不同的慢病毒生产体系中病毒滴度的高低意义不大,重要的是本研究已显示了所获得的慢病毒具有很好的感染能力。实际上,收集慢病毒液上清经过超速离心,可以进一步被浓缩而增加滴度^[8-9,11]。因此,在生产转基因动物时将病毒液超速离心几乎是必不可少的。

ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3 PUFAs)是一类被广泛研究和关注的脂肪酸,对人类及其他哺乳动物的正常发育和保持良好的健康状况极其重要,而且对于人类多种疾病的预防和治疗亦有明显的作用^[12-14]。 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因是合成 ω -3 系列不饱和脂肪酸的关键酶^[15]。线虫 *C. briggsae* 的 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 *sFat1* 是作者自行克隆和鉴定的。研究表明,该基因能够促使 ω -6 系列不饱和脂肪酸转变为相应的 ω -3 系列不饱和脂肪酸^[16]。因此,本研究将该基因构建到慢病毒表达载体上,并且置于乳腺特异性表达启动子 β -casein 之后,以期在今后研究中用于制备乳腺特异性表达 *sFat1* 基因的转基因动物。

总之,本研究初步建立了有效生产慢病毒的方法,为今后进一步利用其感染动物胚胎而生产出具有开发利用价值的转基因动物进行了有益探索。

[参考文献]

- [1] Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science, 1996, 272(5259): 263-267.
- [2] Kim N V, Mithrophanous K, Kingsman S M, et al. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency type 1[J]. J Virol, 1998, 72(1): 811-816.
- [3] Kafri T, Praag H V, Gage F H, et al. Lentiviral vectors: regulated gene expression[J]. Mol Ther, 2000, 1(6): 516-521.
- [4] Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system[J]. J Virol, 1998, 72(11): 8463-8471.
- [5] Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2000, 2(2): 170-176.
- [6] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos[J]. PNAS, 2002, 99(4): 2140-2145.
- [7] Hamra F K, Gatlin J, Chapman K M, et al. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells[J]. PNAS, 2002, 99(23): 14931-14936.
- [8] Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes[J]. Biology of Reproduction, 2004, 71(6): 405-409.
- [9] McGrew M J, Sherman A, Ellard F M, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors[J]. EMBO Reports, 2004, 5(7): 728-733.
- [10] Yu H, Rabson A B, Kaul M, et al. Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines[J]. J Virol, 1996, 70(7): 4530-4537.
- [11] Kaul M, Yu H, Ron Y, et al. Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences[J]. Virology, 1998, 249(1): 167-174.
- [12] Siddiqui R A, Shaikh S R, Sech L A, et al. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action[J]. Mini Rev Med Chem, 2004, 4(8): 859-871.
- [13] Kris-Etherton P M, Hecker K D, Binkoski A E. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health[J]. Nutr Rev, 2004, 62(11): 414-426.
- [14] Mozaffarian D, Ascherio A, Hu F B, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men[J]. Circulation, 2005, 111(3): 157-164.
- [15] Ruxton C H, Reed S C, Simpson M J, et al. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence[J]. J Hum Nutr Diet, 2004, 17(5): 449-459.
- [16] Kang Z B, Ge Y L, Chen Z H, et al. Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* N-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells[J]. PNAS, 2001, 98(7): 4050-4054.